

EXODUSは細胞上清エクソソームの基礎研究と転化応用をサポートする

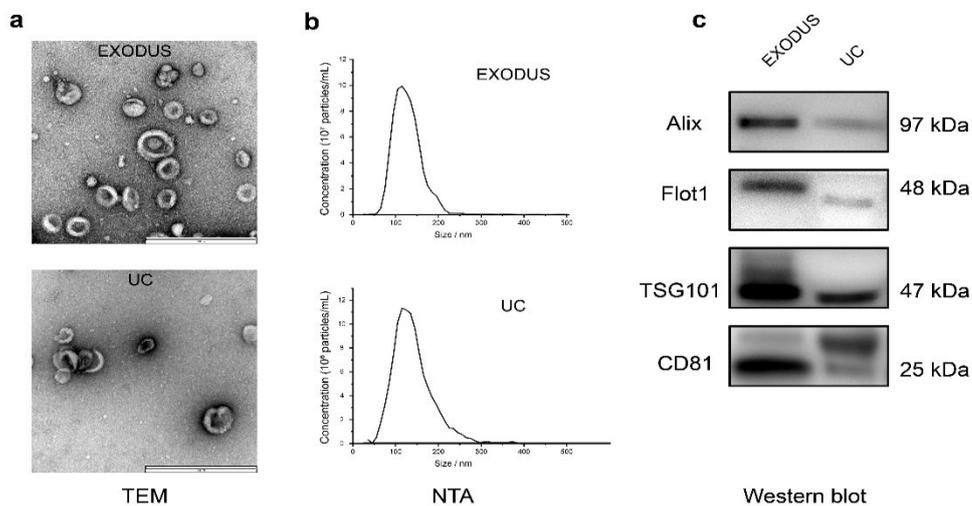
間葉系幹細胞由来エクソソーム (MSC-EVs) は再生医学と免疫調節の面で大きな応用の将来性を示している。すでに研究により MSC-EVs は皮膚細胞の増殖を促進し、そして上皮細胞の再生を加速し、皮膚損傷を修復して瘢痕形成を抑制することができることが明らかになった。変形性関節炎疾患の治療分野において、MSC-EVs は軟骨基質の合成を促進し、基質分解酵素の作用を抑制して変形性関節炎の進行を遅らせることができる。MSC-EVs は眼表点滴或いは硝子体注射などの方式で投与することもでき、リスクが低く、かつ眼部組織構造に効果的に浸透してその治療機能を発揮することができる。しかし、現在依然として有効で拡張可能な細胞上清エクソソームを調製する方法が不足しており、どのように高濃度、高純度、高活性の MSC-EVs を獲得するかは疾病治療研究と転化に応用する肝心な点である。

一、EXODUS 細胞上清サンプル分離操作の流れ



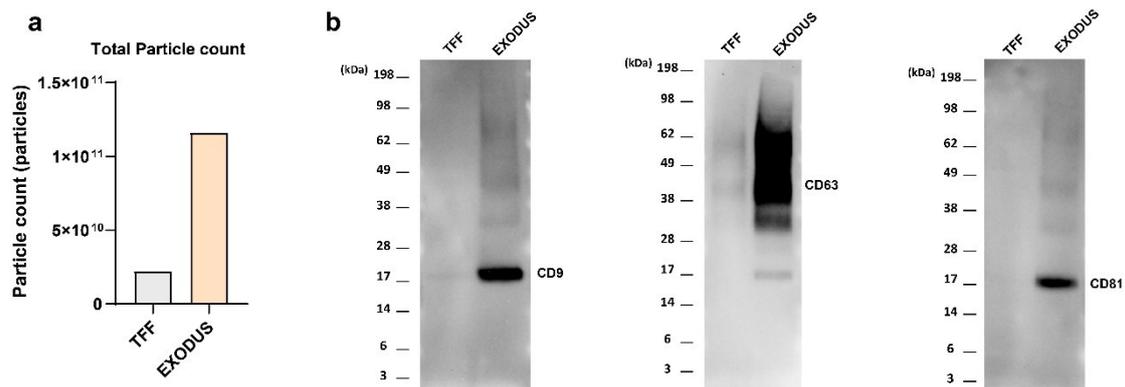
二、細胞上清外分泌体分離結果の展示

1、EXODUS と超遠心分離法(UC)による細胞上清エクソソーム精製結果の展示

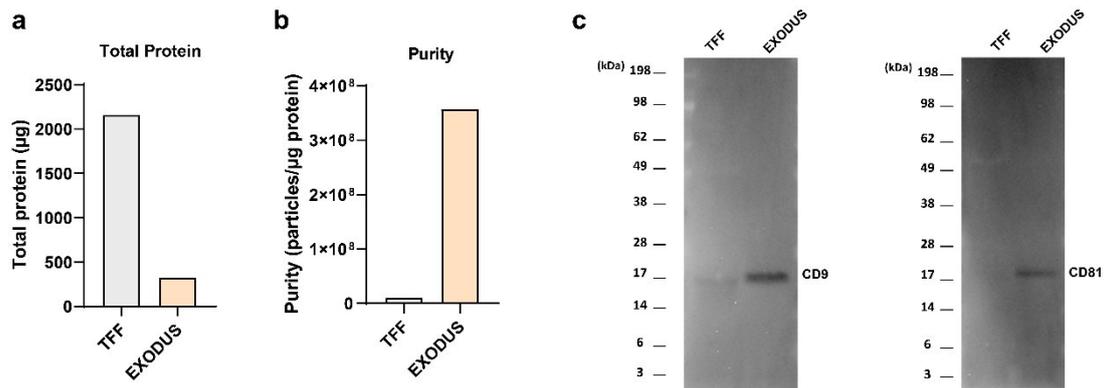


それぞれ EXODUS と UC を用いて 40mL と 38mL 細胞上清培養液外分泌体を分離精製し、透過電子顕微鏡(TEM)、ナノ粒子追跡分析装置(NTA)と Western blot などの実験手段を結合して精製外分泌体に対して特性評価を行った。その結果、EXODUS で精製された外分泌体は完全なカップホルダー状構造を有し、しかも小胞構造の数が多く、背景がきれいであることを示した。UC 精製エクソソームの背景はきれいであるが、小胞構造の数は少なく、部分的に凝集現象がある。EXODUS 精製物粒子濃度は 8×10^{10} particles/mL、UC 精製物粒子数は 8×10^9 particles/mL であった。等体積 Western blot 実験によりエクソソームの生産量を評価した結果、EXODUS 精製産物のエクソソーム関連マーカータンパク質の豊富さは UC より有意に高いことが示された。以上の結果、EXODUS 精製濃縮細胞上清エクソソームの生産量は UC より有意に高いことを示した。

2、EXODUS とクロマトグラフィー法(TFF)による細胞上清エクソソーム精製結果の展示



Xcell Therapeutics Inc.は、EXODUS と TFF デバイスの細胞上清エクソソームの分離・濃縮における性能の違いを評価するために、それぞれ EXODUS と TFF デバイスを用いて 250mL の細胞上清培養液を処理し、NTA、BCA assay と等体積 Western blot 実験技術を組み合わせて精製結果を特性評価した。その結果、EXODUS 生成物粒子の総数は 1.16×10^{11} particles であり、TFF 生成物粒子の総数より有意に高いことが示された。EXODUS 精製物のエクソソームマーカータンパク質 CD9、CD63、CD81 の豊富さは TFF 精製物より有意に高かった。以上の結果、EXODUS 精製細胞上清のエクソソーム生産量は TFF より有意に高いことを示した。



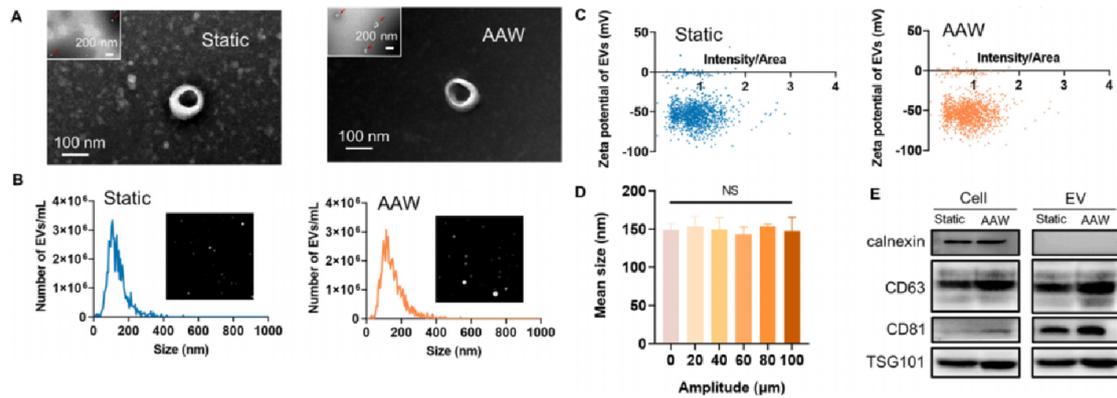
次に、研究者は BCA assay と等粒子 Western blot 実験技術を利用してエクソーム純度を評価し、結果、EXODUS 産物の総タンパク質量は TFF より著しく低く、EXODUS 粒子タンパク質比は 3.57×10^8 particles/ μ g protein であり、TFF より著しく高いことを示した。EXODUS 精製物の CD9 と CD81 タンパク質の豊富さは TFF 精製物より有意に高かった。以上の結果から、EXODUS 精製細胞上清エクソソームの純度と生産量は TFF より有意に高いことが明らかになった。

三、応用事例

1、EXODUS は A549 細胞上清 EVs を分離し、可聴音波を助力して接着癌細胞 EVs の形成と分泌を促進する基礎研究 (Applied Materials&Interfaces.IF=9.500)

研究結果の展示

研究者は EXODUS 抽出システムを用いて AAW 刺激群と静的培養群の細胞上清 EVs の分離を完成し、そして TEM、NTA と Western blot などの技術を用いてエクソソームの鑑定を行った。TEM の結果、静的培養と AAW 刺激条件下で、EVs はすべて古典的なカップ状構造を呈し、しかもその粒径はすべて 30-100nm の間に落ちた；Western Blot で Calnexin とエクソソームマーカータンパク質を検出した結果、細胞と EVs 中の関連マーカータンパク質の発現が一致したことを示した。



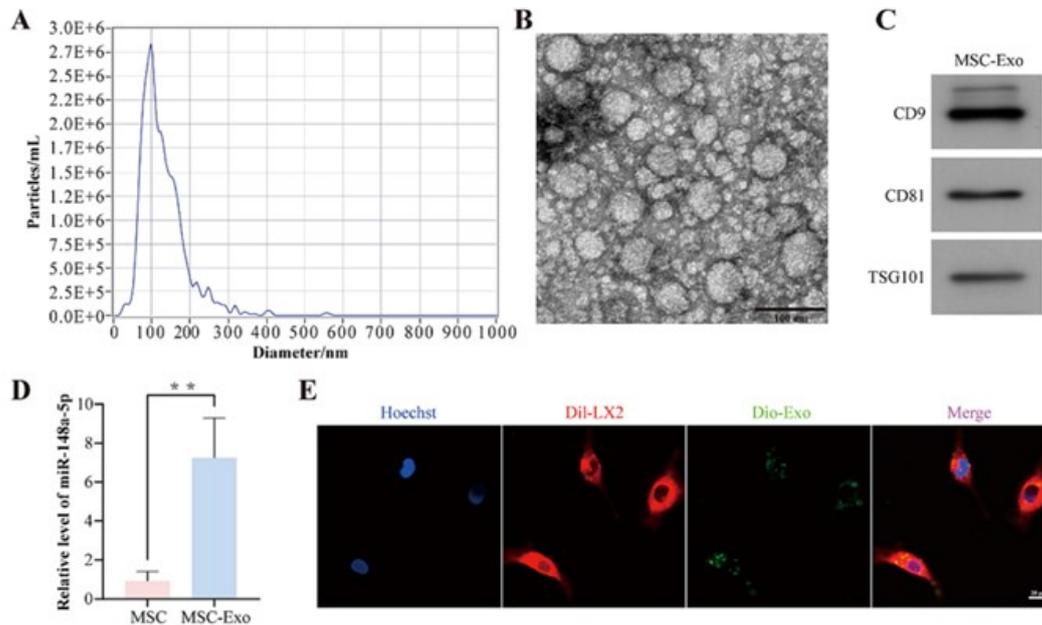
研究のまとめ

研究者は新型 EVs 生物製造方法を開発し、表面音圧や応力などの AAW 振幅によって発生する連続的な機械的刺激を制御することにより、貼り付けがん細胞 EVs の形成と分泌効率を著しく向上させた。従来の静的培養に比べて、72 時間の AAW 刺激は EVs の生産量を 2.5 倍に増加させ、しかも細胞活力に有意な影響を与えなかった。研究チームは 匯芯生物が独自に開発した全自動エクソーム抽出システム「EXODUS」を利用し、高純度、高生産量の EVs の分離に成功した。オミクス分析と体外実験などの技術手段により、AAW が EVs 分泌を促進する制御メカニズムを検討し、AAW 誘導由来 EVs の生物学的機能を評価した。

2、EXODUS によるヒト臍帯間葉系幹細胞外分泌体の分離、肝線維化(LF)治療機序の研究を促進 (International Immunopharmacology.IF=5.600)

研究結果の展示

著者は全自動エクソソーム抽出システム EXODUS を用いて、hUC-MSCs 細胞培養上清培養液から間葉系幹細胞エクソソーム MSC-Exos を分離することに成功した。TEM、NTA 及び Western blot などの多種のエクソソーム鑑定技術を結合し、抽出した MSC-Exos に対して全面的な形態、物理特性及びマーカー評価を行った。TEM 観察結果により、MSC-Exos は典型的なカップ状構造を呈し、かつ二層膜の特徴を備えている、NTA 分析によると、MSC-Exos の平均粒子径は約 100nm であった。Western blot の結果は、CD9、CD81、TSG101 タンパク質のバンドが有意であることを示した。



研究のまとめ

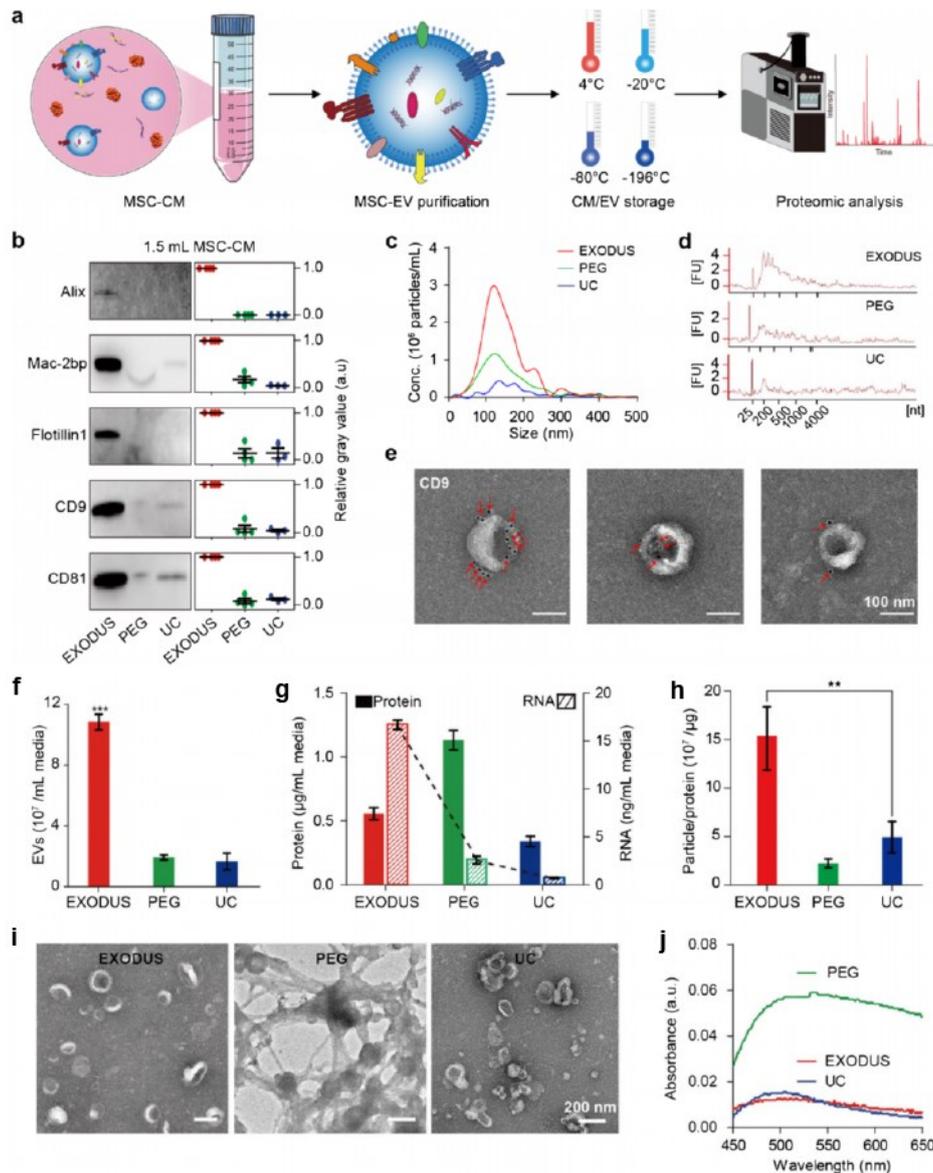
本研究では、hUC-MSCs は HSC 活性化を阻害することによって LF を有意に改善することがわかった。また、匯芯生物が独自に開発した全自動エクソーム抽出システム EXODUS を利用して、hUC-MSCs 細胞上清サンプルから高純度、高生産量の MSCs-Exo を分離精製することに成功し、動物実験及び体外特性特性などの実験手段を通じて MSCs-Exos が miR-148a-5p を送達することによって標的細胞に到達することを検証し、hUC-MSCs 治療の重要な媒体と考えられた。その具体的な作用機序は直接 SLIT3 を標的にして繊維化の進展を調節することである。さらに、SLIT3 は有望なバイオマーカーとして、LF の状態を動的にモニタリングすることができる。

3.EXODUS による高純度、高完全性の間葉系幹細胞由来細胞外小胞の効率的な調製 (Anal Bioanal Chem. IF=4.300)

研究結果の展示

研究者はそれぞれ EXODUS、UC とポリエチレングリコール沈殿(PEG)方法を用いて MSC-EVs の分離精製を行い、Western blot、TEM と NTA 技術を結合して分離結果を特徴づけた。Western blot は、Alix、Mac-2bp、Flotillin 1、CD9、CD81 などの一般的な EVs マーカータンパク質を検出した。その結果、EXODUS 分離結果マーカータンパク質の発現量は UC と PEG より有意に高いことが明らかになった。TEM の結果、EXODUS 分離 EV はカップ状構造を呈し、その周囲には抗 CD9 と共役のナノ金が結合していることが示さ

れた。対照的に、EXODUS が分離した小胞膜の構造の完全性はより高く、背景はよりきれいである。NTA 結合 Qubit タンパク質検出キットは MSC-EVs の生産量と純度を特徴とし、結果は EXODUS の総粒子数が PEG と UC の分離結果より著しく高いことを示した。また、EXODUS 分離 EV の粒子対タンパク質比は $(1.54 \pm 3.47) \times 10^8$ particles/ μ g protein であり、PEG と UC 分離結果より有意に高かった。以上の結果は、PEG と UC 方法と比べて、EXODUS プラットフォームの精製濃縮 MSC-EVs は更に高い粒子生産量と純度を持っていることを示した。



研究のまとめ

研究者は EXODUS を応用して高品質の EVs を効率的に分離し、その純度と生産量はいずれも従来の UC と PEG 沈殿法を超えている。同時に、研究者は MSC-CM と精製後の

EVs の保存条件を深く検討した。研究は、プロテオミクス分析により、EVs のタンパク質含有量と多様性の変化がその治療機能に著しい影響を与えることが示されているため、MSC-EV の品質安定を維持することが重要であることを強調した。研究者は EXODUS を利用して MSC-EVs を調製する戦略は臨床応用の潜在力があり、多種の疾病を治療するために新しいルートを切り開いたと提案した。

四、まとめ

EXODUS 全自動外分泌体抽出システムは高純度、高完全性の外分泌体を効率的に精製し、外分泌体の基礎研究と幹細胞外分泌体の応用と転化研究を支援する。現在、EXODUS 処理細胞上清サンプルは質的飛躍を実現しただけでなく、更に処理量の上で著しい向上を得て、mL レベルから L レベルまでの処理体積の全面的なカバーを完成することができて、同時に精製濃縮された外分泌体の高純度、高生産量と高完全性を維持することを満たすことができます。



[1Zhou C,Zhang B,Yang Y,Jiang Q,Li T,Gong J,Tang H,Zhang Q.Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing.Stem Cell Res Ther.2023;14(1):107.]

[2Zou J,Yang W,Cui W,Li C,Ma C, Ji X,Hong J,Qu Z,Chen J,Liu A,Wu H.Therapeutic potential and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes as bioactive materials in tendon-bone healing.J Nanobiotechnology.2023;21(1):14.]

[3Lei Z,Jiang H,Liu J,Liu Y,Wu D,Sun C,Du Q,Wang L,Wu G,Wang S,Zhang X.Audible Acoustic Wave Promotes EV Formation and Secretion from Adherent Cancer Cells via Mechanical Stimulation.ACS Appl Mater Interfaces.2023;15(46):53859-53870.]

[4Yuan M,Yao L,Chen P,Wang Z,Liu P,Xiong Z,Hu X,Li L,Jiang Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit liver fibrosis via the microRNA-148a-5p/SLIT3 axis.Int Immunopharmacol.2023;125

(Pt A): 111134.]

[5 Ni F,Zhu Q,Li H,Liu F,Chen H.Efficient preparation of high-purity and intact mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.Anal Bioanal Chem.2024;416(8):1797-1808.]